



PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **07203995 A**(43) Date of publication of application: **08.08.95**

(51) Int. Cl.

C12Q 1/66**C12Q 1/06****G01N 21/76**(21) Application number: **06023810**(22) Date of filing: **26.01.94**(71) Applicant: **TOA DENPA KOGYO KK**(72) Inventor:
HAKETA YASUSHI
NISHINO TATSUO
TSUNODA HIROSHI**(54) DETERMINATION OF INTRACELLULAR ATP****(57) Abstract:**

PURPOSE: To quickly determine intracellular ATP for microbial examination, etc., in high sensitivity without diluting the specimen by contacting an extracted specimen of intracellular ATP with an agent for suppressing the inhibition of enzymatic reaction and containing cyclodextrin and applying a biochemical luminescent method to the contact product.

CONSTITUTION: ATP in a cell is determined in high sensitivity for food sanitation, clinical examination, environmental microbial examination, etc., by contacting a specimen containing cells of microorganisms, etc., with an adenosine triphosphate (ATP) extraction reagent containing a surfactant (e.g. dodecyldimethylbenzyl ammonium chloride) to extract the intracellular ATP of the specimen, contacting the extracted specimen with an agent for suppressing the inhibition of enzymatic reaction and containing a cyclodextrin (α - cyclodextrin), adding a

luminescent reagent containing luciferin as a fluorescent substrate and luciferase as a luminescent enzyme to the extracted specimen to apply biochemical luminescent method and measuring the light emitted by the biochemical luminescence caused by the enzymatic reaction of luciferin, luciferase and ATP.

COPYRIGHT: (C)1995,JPO

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-203995

(43) 公開日 平成7年(1995)8月8日

(51) Int.Cl. ⁸	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 Q 1/66		6807-4B		
	1/06	6807-4B		
G 0 1 N 21/76				

審査請求 未請求 請求項の数2 F D (全 11 頁)

(21) 出願番号 特願平6-23810

(22) 出願日 平成6年(1994)1月26日

(71) 出願人 000219451

東亜電波工業株式会社

東京都新宿区高田馬場1丁目29番10号

(72) 発明者 羽毛田 靖

埼玉県狭山市大字北入曾613番地 東亜電
波工業株式会社狭山工場内

(72) 発明者 西野 達夫

埼玉県狭山市大字北入曾613番地 東亜電
波工業株式会社狭山工場内

(72) 発明者 角田 浩

埼玉県狭山市大字北入曾613番地 東亜電
波工業株式会社狭山工場内

(74) 代理人 弁理士 倉橋 暎

(54) 【発明の名称】 細胞内A T Pの測定方法

(57) 【要約】

【目的】 界面活性剤を含んだ抽出試薬により細胞を含む試料から細胞内A T Pを抽出し、これにルシフェラーゼとルシフェリンによる生物化学発光法を適用して細胞内A T Pを測定するに際し、抽出試薬による生物化学発光の酵素反応の阻害を抑制することができ、且つ細胞内A T Pの抽出能力を低下することがない細胞内A T Pの測定方法を提供することである。

【構成】 α -シクロデキストリン等のシクロデキストリンは、界面活性剤を含む抽出試薬の抽出能力を低下させず、且つ酵素反応の阻害を抑制する特性を有するので、これを抽出試薬による酵素反応阻害に対する抑制試薬として使用した。

【効果】 シクロデキストリンの使用により目的の効果を達成ことができ、又測定試料の稀釈を要しないので、測定感度を向上する等の効果もある。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 細胞を含む試料をATP抽出試薬と接触して試料の細胞内ATPを抽出し、次いで抽出試料にルシフェラーゼとルシフェリンによる生物化学発光法を適用して、試料の細胞内ATPを測定する方法において、前記抽出試料をシクロデキストリンを含む酵素反応阻害抑制試薬と接触した後、抽出試料に前記生物化学発光法を適用することを特徴とする細胞内ATPの測定方法。

【請求項2】 ATP抽出試薬が界面活性剤を含む請求項1の測定方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、生物化学発光法を利用した細胞内ATPの測定方法に関する。

【0002】

【従来の技術】大腸菌、酵母菌、乳酸菌及びその他の生細胞数の測定は、食品衛生、バイオ、臨床検査、医学、超純水、環境などの分野において非常に重要である。一般に、細胞数の測定は、成長培地中のコロニーの計測、血球計算盤による顕微鏡下の計測、濁度測定などによって行なわれている。

【0003】成長培地中のコロニー計測による方法は、高感度である、生細胞のみを測定できる、選択培地を用いれば微生物細胞種が同定できる等の点で優れている。しかし、細胞の培養を必要とするので、測定に通常1日以上以上の時間を要し、迅速に結果を得たい場合には適さない。

【0004】血球計算盤による方法は、顕微鏡を用いるために操作が煩雑である、自動化が困難である等の欠点を有している。

【0005】濁度測定による法は、迅速で自動化が容易である点で優れているが、感度が低い、生細胞と死細胞の細胞数が区別ができない、発酵乳などベースの濁度が高い試料には適用できない等の問題点を有している。

【0006】ところで、上記分野における細胞数測定には、迅速且つ高感度の測定が要求される。例えば食品衛生の分野では、製品出荷のために製品の微生物汚染の検査は必要不可欠である。従来、この検査はコロニー計測法によって行なわれているが、検査に1日以上を要するために、結果が出るまで製品を倉庫に保管しておかねばならない。このため流通効率の点で問題があるだけでなく、牛乳などの製品では保管時間が長くなるにつれて微生物汚染の可能性が高くなる。又食品で汚染を問題にする微生物濃度は総じて低濃度であるので、高感度な検査が要求される。

【0007】上記の要求を満たす微生物濃度測定法として、生きた微生物中に必ず存在するアデノシン3リン酸(ATP)を生物化学発光法を用いて測定する方法が知られている。この方法は微生物に含まれるATP濃度が微生物濃度に比例することを利用しており、測定時間が

短く、高感度であるために非常に有効な方法である。

【0008】生物化学発光法による測定では、蛍光の基質であるルシフェリンとその酵素のルシフェラーゼが用いられる。この方法を用いて微生物細胞のATP濃度を測定するには、細胞中に含まれるATPを抽出する必要がある。

【0009】細胞のATP抽出法としては、トリクロロ酢酸(TCA)の水溶液を微生物に加えて抽出する方法(TCA法)、界面活性剤水溶液で抽出する方法(界面活性剤法)、90℃のトリス緩衝液で抽出する方法(トリス緩衝液法)、エタノールを用いる方法(エタノール法)、リゾチームなどの溶菌酵素を用いる方法(酵素法)等がある。

【0010】しかしながら、TCA法、エタノール法、界面活性剤法は、生物化学発光の酵素反応を阻害する場合が多い上に、希釈やpH調整などの前処理を必要とし、操作が煩雑で感度を低下させる場合が多い。トリス緩衝液法は抽出溶液を90℃の高温に熱する必要がある、操作面での煩わしさがある。酵素法は抽出に時間がかかり、試薬が高価で不安定という問題もある。

【0011】

【発明が解決しようとする課題】以上、いずれの方法も一長一短があり、場合に応じて使い分けられているのが現状であるが、比較的多用されているのが界面活性剤法である。一般に陽イオン性界面活性剤を用いる。

【0012】この方法は、上述したように、生物化学発光の酵素反応を阻害する場合が多く、その阻害度合は界面活性剤の濃度が高いほど大きくなる。抽出能力は界面活性剤濃度が高いほど大きくなるので、界面活性剤濃度が低いと酵素反応の阻害を小さくできるが、抽出能力が不十分となる。従って界面活性剤法では酵素反応を阻害せず、抽出能力が高い方法が望まれている。

【0013】従って本発明の目的は、界面活性剤を含んだ抽出試薬により細胞を含む試料から細胞内ATPを抽出し、これにルシフェラーゼとルシフェリンによる生物化学発光法を適用して細胞内ATPを測定するに際し、抽出試薬による生物化学発光の酵素反応の阻害を抑制することができ、且つ細胞内ATPの抽出能力を低下することがない細胞内ATPの測定方法を提供することである。

【0014】

【課題を解決するための手段】上記目的は本発明に係る細胞内ATPの測定方法にて達成される。要約すれば本発明は、細胞を含む試料をATP抽出試薬と接触して試料の細胞内ATPを抽出し、次いで抽出試料にルシフェラーゼとルシフェリンによる生物化学発光法を適用して、試料の細胞内ATPを測定する方法において、前記抽出試料をシクロデキストリンを含む酵素反応阻害抑制試薬と接触した後、抽出試料に前記生物化学的発光法を適用することを特徴とする細胞内ATPの測定方法であ

る。ATP抽出試薬は界面活性剤を含む。

【0015】以下、本発明について詳述する。

【0016】本発明は、界面活性剤を含んだ抽出試薬による細胞内ATPの抽出と、これへの生物化学発光法の適用とによって細胞内ATPを測定する方法において、抽出試薬の抽出能力を低下させず、且つ酵素反応の阻害を抑制することが可能な酵素反応阻害抑制試薬（抑制試薬）を発見したことによって達成されたものである。即ち、界面活性剤は細胞からATPを抽出するために使用されるが、生物化学発光の酵素反応を阻害する場合が多く、本発明の特徴は、この阻害を抑制するために、シクロデキストリンを含んだ抑制試薬を接触させることにある。

【0017】生物化学発光法を用いた細胞内ATPの測定は、細胞を含んだ試料を界面活性剤を含んだ抽出試薬と接触させて、細胞内ATPを細胞外に抽出した後、抽出したATPを蛍光の基質であるルシフェリンと酵素であるルシフェラーゼを含んだ発光試薬と接触し、ルシフェリン、ルシフェラーゼ及びATPによる酵素反応により生物化学発光させ、その生成した光を測定する方法が一般的である。本発明では、このとき、シクロデキストリンを含んだ抑制試薬を発光試薬に添加するか、試料又は抽出試薬を抑制試薬に接触した後、発光試薬と接触させることにより、界面活性剤による生物化学発光の酵素反応を抑制することが可能である。

【0018】これらの試薬の接触操作は、手操作による方法、ポンプ等の装置による方法、フローインジェクション分析法（FIA法）又はこれらを組合せた方法等により行なうことができ、発光量の測定は、バッチ式又はFIA法などの流れを利用した分析法で行なうことができる。FIA法においては、キャリア液に抑制試薬を添加することによっても本発明の目的を達成することが可能である。

【0019】上述のいかなる方法によらず、抑制試薬を接触させる工程は、抽出したATPを発光試薬と接触させるのと同時か、発光試薬と接触させる以前が、生物化学発光の酵素反応の阻害を抑制する点で好ましい。

【0020】抽出試薬に用いる界面活性剤には、アルキルジメチルベンジルアンモニウムクロライド、塩化ベンゼトニウム、セチルトリメチルアンモニウムクロライド、Triton X-100（商品名）等を好適に使用することができる。抑制試薬に用いるシクロデキストリンとしては、界面活性剤の種類、濃度により、 α -シクロデキストリン、 β -シクロデキストリン、 γ -シクロデキストリンのいずれか1種又は複数種を選択して使用することができる。

【0021】本発明の具体例について説明する。

【0022】

【実施例】

実施例1

先ず、抽出試薬の化学発光反応阻害に対するシクロデキストリンの抑制効果を示す試験について述べる。発光の測定にはバッチ式の生物化学発光測定装置を使用した。抽出試薬の界面活性剤にはドデシルジメチルベンジルアンモニウムクロライド（塩化ベンザルコニウム）を使用し、又抑制試薬には α -シクロデキストリンを使用した。

【0023】上記の塩化ベンザルコニウムは殺菌剤として知られており、細胞の細胞壁に作用してATPなどの比較的小さい分子を透過させる能力を有している。従ってATPを抽出する能力は非常に高く、抽出試薬として優れている。ATPの抽出は、抽出試薬の一定量に細胞を懸濁させた懸濁液を一定量加えて攪拌することにより成し遂げられる。十分な抽出能力を発現させるためには、懸濁液と抽出試薬を混合したときの混合液に対し、塩化ベンザルコニウム濃度が0.05%以上になるようにすることが好ましい。しかしながら、塩化ベンザルコニウムが0.05%以上の濃度では、生物化学発光によりATP濃度を測定する工程で酵素反応を著しく阻害するため、抽出後に緩衝液などにより希釈することが必要になる。

【0024】本発明では、 α -シクロデキストリンを含んだ抑制試薬を加えるので、抽出後に希釈等を行うことなく、上記の阻害を抑制することが可能である。

【0025】測定操作は以下の通りである。100nmol/lのATP標準液をキュベットに100 μ l入れ、0.1%塩化ベンザルコニウムと1mMのEDTAをpH7.75HEPES緩衝液に溶解した抽出試薬（これを抽出試薬Aとする）を100 μ l加えて攪拌し、ATPを抽出する。更に2%の α -シクロデキストリンと1mMのEDTAをpH7.75HEPES緩衝液に溶解した抑制試薬（これを抑制試薬aとする）を50 μ l加えて攪拌した後、蛍のルシフェリン、ルシフェラーゼを含んだ発光試薬（東亜電波工業製ATPA-1L1）を100 μ l加えて攪拌する。そしてキュベットを生物化学発光測定装置にセットし、生物化学発光反応によって生じた光を測定し発光量を求める。発光量はキュベットをセットした後、5秒後から始めて0.1秒間隔で発光を30秒間計測し、これを積算して求めた。

【0026】抽出試薬Aと抑制試薬aに加えたEDTAは、細胞を抽出試薬に接触したときにATPを分解するアルカリフォスファターゼなどの酵素作用を抑制する目的で使用している。pH7.75HEPES緩衝液は、生物化学発光法を用いてATPを測定する酵素を至適状態に保つために必要である。

【0027】表1にATP測定に対する発光量と相対発光量を示す。比較のために、上記の抑制試薬aの組成から α -シクロデキストリンを除いたもの（抑制試薬b）と、1mMのEDTAをpH7.75HEPES緩衝液に溶解した試薬（抽出試薬B）を用いた場合を試した。

【0028】

【表1】

抑制試薬	抽出試薬	発光量 (mV・S)	相対発光量 (%)
a	A	152348	92
b	A	4404	2.7
b	B	165741	100

【0029】ブランクとして使用した抑制試薬bと抽出試薬Bの組合せでは、 α -シクロデキストリンと界面活性剤を含んでいないので、生物化学発光の酵素反応に対する阻害はないと考えられる。そこでこれを基準に選んで相対発光量100%とする。表1に示されるように、本発明による抑制試薬aと抽出試薬Aの組合せでは、相対発光量は抑制試薬bと抽出試薬Bの組合せのときの92%であり、発光反応の阻害が抑制されている。 α -シクロデキストリンを含まない抑制試薬bと抽出試薬Aの組合せの場合には、相対発光量は僅か2.7%であり、発光反応の阻害が極めて大きいことが分かる。

【0030】以上のように、 α -シクロデキストリンを含んだ抑制試薬を添加することにより、生物化学発光の酵素反応に対する阻害をほぼ抑制できることが確認された。

【0031】次に、本発明法による微生物細胞内ATPの測定を、従来法による測定と比較して示す。従来法は、ATPの抽出にトリクロロ酢酸(TCA)を用いるTCA抽出法に依った。TCA抽出法は一般に微生物からATPを抽出する場合に用いられる方法で、ATPの抽出能力に非常に優れている。測定試料には乳酸菌懸濁液を用いた。

【0032】TCA抽出液による微生物中のATPの測定操作は以下の通りである。乳酸菌懸濁液の試料100 μ lに5%のトリクロロ酢酸溶液を0.9ml加えて60秒間攪拌し、乳酸菌からATPを抽出する。この試料を50 μ l分取し、pH7.75 HEPES緩衝液9.95mlを加えて良く攪拌する。この試料100 μ lをキュベットに取り、発光試薬100 μ lを添加攪拌し、

* 前述の生物化学発光測定装置にセットし、発光量を求める。そして既知濃度のATP標準液100 μ lについて生物化学発光測定装置で測定した発光量と比較して、ATP濃度を求めた。

【0033】上記のpH7.75 HEPES緩衝液を加えて攪拌する操作は、トリクロロ酢酸が生物化学発光の酵素反応を大きく阻害するので、これを防ぐために必要である。しかし、試料溶液がトリクロロ酢酸と緩衝液により大きく希釈(本例では2000倍に希釈)されてしまい、測定感度の低下が起こり、TCA抽出法の問題点になっている。

【0034】本発明による抑制試薬aを用いた微生物細胞内ATPの測定操作は以下の通りである。乳酸菌懸濁液の試料100 μ lをキュベットに入れ、抽出試薬Aを100 μ l加えて60秒間攪拌し、乳酸菌からATPを抽出する。更に抑制試薬aを50 μ l加えて攪拌した後、発光試薬100 μ lを加えて攪拌し、生物化学発光測定装置にキュベットをセットし、生物化学発光反応によって生じた光の発光量を測定する。発光量は、上述したように、キュベットをセットした後、5秒後から始めて0.1秒おきに発光を30秒間計測し、これを積算して求めた。抑制試薬bと抽出試薬A、抑制試薬bと抽出試薬Bの組合せについても同様な操作をして、発光量を測定した。そして既知濃度のATP標準液100 μ lについて生物化学発光測定装置で測定した発光量と比較して、ATP濃度を求めた。これらの結果及びTCA抽出法による結果を表2に示す。

【0035】

【表2】

* 40

抑制試薬	抽出試薬	1.7×10 ⁵ 個/ml	1.7×10 ⁶ 個/ml	1.7×10 ⁷ 個/ml
なし	TCA	0.45 (100%)	4.02 (100%)	39.2 (100%)
a	A	0.44 (98%)	3.29 (82%)	32.0 (82%)
b	A	0.02 (4.4%)	0.16 (4.0%)	3.60 (9.2%)
b	B	0 (0%)	0.02 (0.5%)	0.15 (0.4%)

単位: nmol/l. () 内はTCA法を100%とした相対濃度。

【0036】表2に示されるように、本発明による抑制試薬aと抽出試薬Aの組合せでは、TCA法による測定値とほぼ同等な結果が得られているが、 α -シクロデキストリンを加えない抑制試薬bと抽出試薬Aの組合せでは、発光の酵素反応が阻害されるので、TCA法に比べると低いATP濃度しか得られない。又抑制試薬bと界面活性剤を含まない抽出試薬Bの組合せでは、抽出が全く起こらないために、ATP濃度の測定値がゼロとなっている。以上のように、本発明に基づくシクロデキストリンを含んだ抑制試薬aと抽出試薬Aの組合せが優れた結果を示した。

【0037】この本実施例による測定では、試料溶液は抽出試薬と抑制試薬の添加によりわずか2倍強にしか希釈されない。抑制試薬を添加しない場合、従来の方法であると試料溶液の20倍以上の希釈が必要であり、TCA法に至っては2000倍もの希釈が必要であることを考慮すると、本発明の方法は感度の点で非常に有利となる。

【0038】上記において、塩化ベンザルコニウムの濃度は、抽出試薬1容に対し微生物を含んだ試料1容という条件では0.1%以上が好ましいが、微生物濃度が低濃度である場合には必ずしも0.1%以上である必要はなく、塩化ベンザルコニウムの濃度を適宜低くすることができる。塩化ベンザルコニウムの濃度は、抽出を行なう細胞の種類によっても使い分けることが好ましい。

【0039】抑制試薬に添加する α -シクロデキストリンの濃度は、抽出を行なった試料1容に対して、添加試薬0.5容積という条件では2%以上好ましいが、塩化ベンザルコニウム濃度が0.1%以下の場合には必ずしも2%以上である必要はない。 α -シクロデキストリン濃度はある程度高いほど発光反応の阻害を抑制する効果が大いだが、必要以上に高いと逆に酵素反応を阻害するので、適当な濃度を使用するのが好ましい。塩化ベンザルコニウム、 α -シクロデキストリンの濃度は、上述の例に限られず、試料、抑制試薬、抽出試薬、発光試薬の使用量や種類により適切に設定する必要がある。

【0040】 α -シクロデキストリンの代わりに β -シ

* クロデキストリンを用いても同様な効果がある。又 α -シクロデキストリンと β -シクロデキストリンの混合液を抑制試薬として用いても良い。 γ -シクロデキストリンも抽出試薬に対する阻害抑制効果があるが、塩化ベンザルコニウムに対しては抑制効果が小さいので、この場合には適さない。

20 【0041】抑制試薬、抽出試薬に添加するEDTA及びpH緩衝液は必ずしも両試薬に入れる必要はなく、いずれか一方に添加すれば良い。抽出時間が短い場合には必ずしもEDTAの添加は必要ではなく、pH緩衝液は測定したい試料のpHが中性付近であれば使用する必要はない。

30 【0042】ATPの抽出に要する時間は微生物の種類により異なるが、大腸菌、乳酸菌、一般細菌では10秒以上、酵母菌の場合には30秒以上が好ましい。抽出を行なってから試料を放置しておくATP濃度は少しずつ低下するので、発光量の測定は抽出後5分以内に行なうことが好ましく、特にEDTAを含んでいない抽出試薬を使用する場合には、抽出が完了してからすぐに測定するのが好ましい。又この例では試薬の添加を手操作により行なっているが、ポンプや自動シリンジを利用して試薬を自動的に添加しても良く、これにより更に簡便に細胞内ATPを測定することができる。

40 【0043】実施例2
本実施例では、発光試薬に抑制試薬を添加する場合について示す。抽出試薬の界面活性剤として塩化ベンゼトニウムを、抑制試薬として β -シクロデキストリンをそれぞれ使用した。測定装置はバッチ式の生物化学発光測定装置を用いた。

【0044】又蛍のルシフェラーゼ、ルシフェリンを含んだ発光試薬（東亜電波工業製ATPA-1L1）に抑制試薬の0.3%の β -シクロデキストリンを添加した発光試薬（発光試薬X）と、0.1%塩化ベンゼトニウムと1mMのEDTAをpH7.75HEPES緩衝液に溶解した抽出試薬（抽出試薬C）を使用した。

【0045】測定操作は次の通りである。100nmol/lのATP標準液100 μ lをキュベットに入れ、

抽出試薬Cを100 μ l加えて攪拌し、ATPを抽出する。次に本発明に基づく発光試薬Xを100 μ l加えて攪拌し、生物化学発光測定装置にキュベットをセットし、生物化学発光反応によって生じた光の発光量を測定する。発光量はキュベットをセットした後、5秒後から始めて0.1秒間隔で発光を30秒間計測し、これを積算して求めた。

【0046】表3には、各発光試薬と抽出試薬のATP *

* 測定に対する発光量と相対発光量を示した。比較のために、上記の発光試薬組成から β -シクロデキストリンを除いたもの(発光試薬Y)と、1mMのEDTAをpH 7.75 HEPES緩衝液に溶解した抽出試薬(前述の抽出試薬B)を用いた場合についても示した。

【0047】

【表3】

発光試薬	抽出試薬	発光量 (mV·S)	相対発光量 (%)
X	C	131784	84
Y	C	16643	11
Y	B	156355	100

【0048】発光試薬Yと抽出試薬Bの組合せでは、 β -シクロデキストリンと界面活性剤を含んでいないために発光反応への阻害はなく、相対発光量は100%と考えられる。本発明による発光試薬Xと抽出試薬Cの組合せでは、表3に示されるように、相対発光量は発光試薬Yと抽出試薬Bの組合せの場合の84%であり、大きな阻害はない。一方、 β -シクロデキストリンを含まない従来法に基づく発光試薬Yと抽出試薬Cの組合せでは、相対発光量は11%と低く阻害が大きいことが分かる。以上のように、発光試薬に β -シクロデキストリンを加えても、本発明の効果が得られることが分かる。

【0049】次に本発明による微生物細胞内ATP測定を、従来法による測定との比較において示す。試料は酵母菌懸濁液を用いた。従来法は、実施例1と同様、ATPの抽出にTCA抽出法を用いる方法で、その微生物細胞内ATPの測定操作は実施例1で説明した通りである。

※ 【0050】本発明による発光試薬Xを用いた微生物細胞内のATPの測定操作は以下の通りである。酵母菌懸濁液の試料100 μ lをキュベットに入れ、抽出試薬Cを100 μ l加えて30秒間攪拌し、酵母菌からATPを抽出する。更に発光試薬を100 μ l加えて攪拌し、生物化学発光測定装置にキュベットをセットし、生物化学発光反応によって生じた光の発光量を測定する。発光量はキュベットをセットした後、5秒後から始めて0.1秒おきに発光を30秒間計測し、積算して求めた。

【0051】発光試薬Yと抽出試薬C、発光試薬Yと抽出試薬Bの組合せについても同様な操作により発光量を測定した。そして既知濃度のATP標準液100 μ lについて生物化学発光測定装置で測定した発光量と比較して、ATP濃度を求めた。これら及びTCA法による結果を表4に示す。

【0052】

【表4】

発光試薬	抽出試薬	1.3 $\times 10^3$ 個/ml	1.3 $\times 10^4$ 個/ml	1.3 $\times 10^5$ 個/ml
Y	TCA	0.14 (100%)	1.55 (100%)	15.3 (100%)
X	C	0.16 (114%)	1.52 (98%)	15.1 (99%)
Y	C	0 (0%)	0.02 (1.3%)	0.20 (1.3%)
Y	B	0 (0%)	0 (0%)	0.01 (0.1%)

単位: nmol/l. ()内はTCA法を100%とした相対濃度。

【0053】表4に示されるように、本発明に基づく発光試薬Xと抽出試薬Cの組合せでは、TCA法による測

★ 定値と同等な結果が得られている。これに対し、 β -シクロデキストリンを加えない発光試薬Yと抽出試薬Cの

組合せでは、発光の酵素反応の阻害を防止できないために、TCA法に比べ低いATP濃度しか得られない。又界面活性剤を含まない抽出試薬Bを使用した場合には、ほとんど抽出が起らないために、ATPの測定値がほぼゼロとなっている。従って本発明に基づく発光試薬Xと抽出試薬Cの組合せが優れていることは明らかである。

【0054】界面活性剤の濃度とシクロデキストリンの濃度及び抽出時間については、実施例1と同様な注意が必要である。β-シクロデキストリンの代わりにγ-シクロデキストリンを用いても同様な効果がある。又β-シクロデキストリンとγ-シクロデキストリンの混合液を抑制試薬として用いても良い。α-シクロデキストリンの阻害抑制効果は塩化ベンゼトニウムに対しては小さいので、他の抽出試薬に対しては使用できるが、この場合には適さない。

【0055】実施例3

本実施例においても、発光試薬に抑制試薬を添加して使用した。界面活性剤としてTritonX-100を、抑制試薬としてγ-シクロデキストリンを使用した。測定装置はこれまでと同様、バッチ式の生物化学発光測定装置である。

【0056】TritonX-100は、ほとんどの微 *

* 生物細胞に対しATP抽出能力を示さず、動物の体細胞のみからATPを抽出する能力があることが知られている。そのために動物細胞と微生物細胞のATPを別々に測定したい場合に使用されることがあるが、塩化ベンザルコニウムなどの陽イオン性界面活性剤と同様に生物化学発光反応を阻害するため、同様にATP測定感度の低下などの問題を有している。

【0057】本実施例では、蛍のルシフェラーゼ、ルシフェリンを含んだ発光試薬（東亜電波工業製ATPA-1L1）に抑制試薬の0.5%のγ-シクロデキストリンを添加した発光試薬（発光試薬Z）と、0.1% TritonX-100と1mMのEDTAをpH7.75 HEPES緩衝液に溶解した抽出試薬（抽出試薬D）を使用した。比較のために、上記の発光試薬組成からγ-シクロデキストリンを除いた発光試薬（前述の発光試薬Y）と、1mMのEDTAをpH7.75 HEPES緩衝液に溶解した抽出試薬Bを用いた場合についても試験した。

【0058】阻害抑制の測定は実施例2と同様な方法で行なった。表5には各発光試薬と抽出試薬のATP測定に対する発光量と相対発光量を示した。

【0059】

【表5】

発光試薬	抽出試薬	発光量 (mV·S)	相対発光量 (%)
Z	D	148507	95
Y	D	54181	35
Y	B	156355	100

【0060】発光試薬Yと抽出試薬Bの組合せでは、γ-シクロデキストリンと界面活性剤を含んでいないため発光反応への阻害がなく、相対発光量は100%と考えられる。本発明による発光試薬Zと抽出試薬Cの組合せの場合の相対発光量は、表5に示されるように、発光試薬Yと抽出試薬Bの組合せの場合の95%であり、ほとんど阻害はない。γ-シクロデキストリンを含まない従来法に基づく発光試薬Yと抽出試薬Dの組合せでは、相対発光量は35%と低く、阻害が大きいことが分かる。以上のように、発光試薬にγ-シクロデキストリンを加えることによって、本発明の効果が得られることが分かる。

【0061】次に本発明による動物体細胞内ATPの測 ※

※ 定を従来法との比較において示す。試料はマウスの肺細胞懸濁液を用いた。従来法は、これまでと同様、TCA抽出法によるATPの抽出を行なう方法である。TCA抽出法及び本発明による発光試薬Zと抽出試薬Dを用いた細胞内ATPの測定操作は、実施例2で説明した通りである。

【0062】発光試薬Yと抽出試薬D、発光試薬Yと抽出試薬Bの組合せについても同様な操作により発光量を測定し、既知濃度のATP標準液100μlについて生物化学発光測定装置で測定した発光量と比較して、ATP濃度を求めた。これらの結果を表6に示す。

【0063】

【表6】

発光試薬	抽出試薬	6×10^2 個/ml	6×10^3 個/ml	6×10^4 個/ml
Y	TCA	2.7 (100%)	27 (100%)	258 (100%)
Z	D	2.6 (96%)	26 (96%)	268 (104%)
Y	D	1.1 (41%)	10 (37%)	102 (40%)
Y	B	0 (0%)	0.1 (0.4%)	0.1 (0%)

単位: nmol/l. ()内はTCA法を100%とした相対濃度。

【0064】表6に示されるように、本発明に基づく発光試薬Zと抽出試薬Dの組合せでは、TCA法による測定値と同等な結果が得られているが、γ-シクロデキストリンを加えない発光試薬Yと抽出試薬Dの組合せでは、発光の酵素反応を阻害するためにTCA法に比べると低いATP濃度しか得られない。又界面活性剤を含まない抽出試薬Bでは全く抽出が起こらないために、ATP濃度の測定値はほぼゼロとなっている。本発明に基づく発光試薬Zと抽出試薬Dの組合せが優れていることは明らかである。

【0065】上記において、界面活性剤の濃度とシクロデキストリンの濃度及び抽出時間については、実施例1と同様な点を注意することが必要である。γ-シクロデキストリンの代わりにβ-シクロデキストリンを用いても同様な効果がある。β-シクロデキストリンとγ-シクロデキストリンの混合液を抑制試薬として用いても良い。又α-シクロデキストリンの阻害抑制効果は、他の抽出試薬に対しては有効であるが、Triton X-100に対しては小さいのでこれには適さない。

【0066】実施例4

本実施例では、FIA法（フローインジェクション分析法）によるATP測定装置を使用し、これに本発明を適用して細胞中のATP濃度を測定する方法について説明する。測定装置の一例を図1に示す。

【0067】本装置は、ルシフェラーゼとルシフェリンを含んだ発光試薬2の輸送ポンプ8及び流路21と、発光試薬用キャリア液1の輸送ポンプ7及び流路26と、キャリア液1及び発光試薬2のインジェクタ13及び混合器16と、細胞を含んだ試料溶液4の輸送ポンプ10及び流路22と、試料溶液用キャリア液3の輸送ポンプ9及び流路27と、キャリア液3及び試料溶液4のインジェクタ14及び混合器17と、キャリア液1、キャリア液3、発光試薬2及び試料溶液4の混合器18及び混合流路28と、化学発光検出器19と、そしてコンピュータ20とを備えてなっている。

【0068】上記の測定装置により試料溶液4のATP濃度を測定するには、発光試薬2をポンプ8により流路

* 21を通して輸送してインジェクタ13に導入し、ATPを含んだ試料溶液4をポンプ10により流路22を通して輸送してインジェクタ14に導入する一方、キャリア液1をポンプ7によりインジェクタ13に送液し、キャリア液3をポンプ9によりインジェクタ14に送液する。これによってキャリア液1で発光試薬2を流路26に注入し、同時にキャリア液3で試料溶液4を流路27に注入する。流路26に注入された発光試薬2は混合器16でキャリア液1と混合され、その発光試薬2を含んだキャリア液1を流路26を通して混合流路28に導入する。同様に、流路27に注入された試料溶液4を混合器17でキャリア液3と混合し、その試料溶液4を含んだキャリア液3を流路27を通して混合流路28に導入する。これによって混合流路28において発光試薬2を含んだキャリア液1及び試料溶液4を含んだキャリア液3を一緒に合せ、混合器18で発光試薬2及び試料溶液4を混合して、生物化学発光反応を行なわせる。

【0069】そしてその反応により発生した光を化学発光検出器19で検出し、電気信号に変換してコンピュータ20に送り、コンピュータ20で信号の積分値を計算し発光量を求める。求めた発光量と試料溶液4のATP濃度は比例するので、予め既知量のATP標準液について測定して求めた発光量と、試料溶液4の発光量をコンピュータ20で比較計算することにより、試料溶液4のATP濃度が求まり、ATP濃度が測定される。

【0070】上記において、細胞を含んだ試料溶液4のATP濃度を測定装置で測定する前に、試料溶液4中の細胞内ATPは抽出試薬により抽出する必要がある。このときATPを抽出した試料溶液を従来法で測定すると、抽出試薬の界面活性剤により生物化学発光の酵素反応が阻害され、定量的な測定結果が得られない。これに対し、本発明では、シクロデキストリンを含んだ抑制試薬を例えばキャリア液1又はキャリア液3に添加するので、生物化学発光反応の阻害を抑制して定量的な結果を得ることができる。

【0071】上記の測定装置において、抽出試薬の界面活性剤としてセチルトリメチルアンモニウムクロライド

を、抑制試薬のシクロデキストリンとして α -シクロデキストリンを使用した例を、以下に詳しく説明する。

【0072】キャリヤ液1及びキャリヤ液3は、0.5% α -シクロデキストリン、15mM硫酸マグネシウムと1mMのEDTAをpH7.75HEPES緩衝液に溶解した溶液（キャリヤ液u）を使用した。この方法ではキャリヤ液が抑制試薬を兼ねていることになる。蛍のルシフェラーゼ、ルシフェリンを含んだ発光試薬（東亜電波工業製ATPA-1L1）（発光試薬Y）を使用した。抽出試薬は0.1%セチルトリメチルアンモニウムクロライドと1mMのEDTAをpH7.75HEPES緩衝液に溶解した溶液（抽出試薬E）を使用した。比較のために、上記キャリヤ液から α -シクロデキストリンを除いた溶液（キャリヤ液v）と、抽出試薬Eからセチルトリメチルアンモニウムクロライドを除いた溶液（前出の抽出試薬B）を用いた場合について検討した。上記試薬を用いたATP測定に対する阻害の度合の測定操作を以下に示す。

*

キャリヤ液1、3 抽出試薬 発光量 (mV·S) 相対発光量 (%)

u	E	3725846	94
v	E	988120	25
v	B	3952481	100

【0076】キャリヤ液vと抽出試薬Bの組合せでは、 α -シクロデキストリンと界面活性剤を含んでいないため発光反応への阻害はなく、相対発光量は100%と考えられる。本発明によるキャリヤ液uと抽出試薬Eの組合せでは、キャリヤ液vと抽出試薬Bの組合せと比較した相対発光量は94%であり、阻害がほとんどない。 α -シクロデキストリンを含まない従来法に基づくキャリヤ液vと抽出試薬Eの組合せでは相対発光量は25%と低く、阻害が非常に大きいことが分かる。以上のように、キャリヤ液1、3に α -シクロデキストリンを加えることにより、酵素反応の阻害を抑制する効果があることは明確である。

【0077】次に本実施例による微生物細胞内ATP測定を従来法との比較において示す。測定試料には大腸菌懸濁液を用いた。従来法は、ATPの抽出にトリクロ酢塩によるTCA抽出法を使用する方法で、これまでの例と同じである。

【0078】TCA法による微生物中のATPの測定操 ※

* 【0073】100mmol/lのATP標準液1mlと抽出試薬Eの1mlをキュベットに入れ30秒間攪拌し、試料溶液4とした。キャリヤ液1とキャリヤ液3を流速1ml/分でインジェクタ13、14に送液し、50 μ lの発光試薬2と50 μ lの試料溶液4を流路26、27に注入し、上記操作により発光量を求める。混合器16、17、18には内径0.5mm、外径1.6mm、長さ1mのテフロンチューブをコイル状に巻いたものを使用した。

10 【0074】キャリヤ液1、3がキャリヤ液vであり、これと抽出試薬E又は塩化ベンザルコニウムを含まない抽出試薬Bを使用した場合についても、同操作により10mmol/lのATP標準液を測定した。各キャリヤ液と抽出試薬のATP測定に対する発光量と相対発光量を表7に示す。

【0075】

【表7】

※作は以下の通りである。試料20 μ lに5%のTCA溶液を1.8ml加えて60秒間攪拌し、大腸菌からATPを抽出する。この試料から200 μ lを分取し、pH7.75HEPES緩衝液3.8mlに加えて良く攪拌し、試料溶液4とする。キャリヤ液1とキャリヤ液3にキャリヤ液vを用い流速1ml/分で送液し、50 μ lの発光試薬2と50 μ lの試料溶液4を注入し、上記操作により発光量を求める。

40 【0079】本実施例によるキャリヤ液uと抽出試薬Eの組合せの他に、比較のために、キャリヤ液uと抽出試薬E、キャリヤ液vと抽出試薬Bの組合せについても前述の操作により発光量を測定し、既知濃度のATP標準液50 μ lをATP測定装置で測定したときの発光量と比較してATP濃度を求めた。試料溶液4、発光試薬組成、混合器の条件は上記と同じである。それらの結果を表8に示す。

【0080】

【表8】

キャリヤ液1、3	抽出試薬	5×10 ⁵ 個/ml	5×10 ⁶ 個/ml	5×10 ⁷ 個/ml
v	TCA	0.75 (100%)	7.3 (100%)	72 (100%)
u	E	0.71 (95%)	7.5 (102%)	72 (100%)
v	E	0.18 (25%)	3.2 (44%)	49 (68%)
v	B	0 (0%)	0.1 (1%)	1.5 (2%)

単位: nmol/l。 () 内はTCA法を100%とした相対濃度。

【0081】表8に示されるように、本発明に基づくキャリヤ液uと抽出試薬Eの組合せでは、TCA法による測定値と同等な結果が得られているが、シクロデキストリンを加えないキャリヤ液vと抽出試薬Eの組合せでは、発光試薬の酵素反応を阻害するためにTCA法に比べると低いATP濃度しか得られない。又キャリヤ液vと界面活性剤を含まない抽出試薬Bでは全く抽出が起こらないために、ATP濃度の測定値はほぼゼロとなっている。以上のように、本発明に基づくキャリヤ液uと抽出試薬Eの組合せが明らかに優れている。

【0082】上記において、界面活性剤の濃度とシクロデキストリンの濃度は、界面活性剤とシクロデキストリンの種類によって異なるので、実施例1で説明したような点に留意することが必要である。

【0083】又本実施例のようなFIA法によるATP測定装置を使用する場合、シクロデキストリンを必ずしもキャリヤ液1とキャリヤ液3の両方に添加する必要はなく、キャリヤ液1もしくはキャリヤ液3だけにシクロデキストリンを加えることによっても本発明の目的は達成され、同様な効果が得られる。

【0084】又実施例1のように抑制試薬としてシクロデキストリンを加えて試料溶液4を作成する方法や、実施例2のように発光試薬にシクロデキストリンを添加する方法を用いれば、キャリヤ液にはシクロデキストリンを添加する必要はない。

【0085】α-シクロデキストリンの代わりにβ-シクロデキストリンの混合液を抑制試薬として用いても良い。γ-シクロデキストリンの阻害抑制効果は、セチル *

* トリメチルアンモニウムクロライドに対しては小さいので、この場合には使用に適さない。

【0086】

【発明の効果】以上説明したように、本発明では、ATP抽出試薬の界面活性剤による生物化学発光の酵素反応の阻害に対し、シクロデキストリンを含む抑制試薬を用いたので、酵素反応の阻害を抑制して発光させることができ、その発光を検出することによりATP濃度を正確に測定することができる。又測定試料の稀釈を必要としないために、測定感度の向上を図ることができ、抽出能力を低下させることもなく、操作面でも一層簡単なATP測定方法を構築することができる。従って食品衛生、バイオなどの微生物検査に際し多大な威力を発揮する。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の一実施例で使用したFIA法によるATP測定装置を示す構成図である。

【符号の説明】

- 1、3 キャリヤ液
- 2 発光試薬
- 4 試料溶液
- 7、8、9、10 輸送ポンプ
- 13、14 インジェクタ
- 16、17、18 混合器
- 19 化学発光検出器
- 20 コンピュータ
- 21、22 流路
- 26、27、28 流路

【図 1】

